

**BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND**

03 NOV. 2004

EP04/10889

**PRIORITY  
DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D 16 NOV 2004

WIPO

PCT

**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:**

103 49 162.7

**Anmeldetag:**

22. Oktober 2003

**Anmelder/Inhaber:**

Universität Leipzig, 04109 Leipzig/DE

**Bezeichnung:**Schnelltest zur Diagnose der Alzheimerschen  
Erkrankung**IPC:**

G 01 N, C 12 Q

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 26. Oktober 2004  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

Schäfer

## **Schnelltest zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung**

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung, das auf der quantitativen Bestimmung mitogen exprimierbarer Oberflächenmarker, vorzugsweise CD69, peripher zugänglicher Zellen, z.B. Hautzellen oder Lymphozyten, (a) vor und (b) nach mitogener Stimulation erfolgt, wobei ein bestimmter Stimulationsindex a:b ein Anzeichen für Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadium oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist. Die vorliegende Erfindung betrifft auch Kits, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens geeignet sind.

Die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung ist mit klinischen Mitteln sowie den zur Verfügung stehenden paraklinischen und apparativ-technischen Methoden allein nicht mit letzter Sicherheit zu stellen und bedarf daher stets der autoptischen Verifizierung. Insbesondere in Frühstadien der Erkrankung ist die differentialdiagnostische Abgrenzung anderer Demenzursachen oft schwierig. Gerade in diesen frühen Phasen der Erkrankung ist jedoch eine sichere Stellung der Diagnose aus zweierlei Gründen wichtig. Sie erlaubt zum einen die diagnostische Abgrenzung potentiell behandelbarer Demenzformen und kann diese damit einer effektiven Therapie zuführen, zum anderen ist sie Voraussetzung für jegliche Form der therapeutischen Intervention in den Prozess der Neurodegeneration der Alzheimerschen Erkrankung, der nur in diesen Frühstadien erfolgreich sein kann. Eine derartige diagnostische Sicherheit kann nur durch Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung, d.h. durch leicht zu bestimmende biologische Veränderungen mit einer für die Erkrankung hinreichenden Sensitivität und Spezifität, geleistet werden.

Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung haben damit zum einen diagnostischen Wert, und sollen hierbei insbesondere helfen, Risikogruppen bzw. Patienten in präklinischen Stadien und frühen klinischen Stadien sicher zu identifizieren. Zum anderen dienen Biomarker der Verlaufskontrolle und damit der Prognostik sowie der Kontrolle der Ansprechbarkeit auf therapeutische Interventionen. Ideale Biomarker sollten bestimmten theoretischen und praktischen Anforderungen genügen. Hierzu gehören insbesondere eine hohe Spezifität und Sensitivität, die Fähigkeit, präklinische Stadien zu identifizieren, sowie ein hoher positiver und negativer Vorhersagewert. Die Bestimmung der Biomarker sollte möglichst nicht-invasiv sein und den Patienten nicht belasten oder ängstigen. Die Analysen sollten preiswert sein und sich einfach, möglichst unter Bedingungen der Hausarztpraxis, durchführen lassen. Leider genügt keiner der derzeit bekannten Biomarker der Alzheimerschen Erkrankung den o.g. Anforderungen. Insbesondere aufgrund der geringen Sensitivität und Spezifität der bekannten Biomarker sind diese als diagnostisches Hilfsmittel ungeeignet. Andere diagnostische Untersuchungen mit höherer Sensitivität und Spezifität erfordern aufwendige technische Voraussetzungen und sind daher nicht zum dezentralen Einsatz an einer größeren Patientengruppe geeignet.

Somit liegt der Erfindung im wesentlichen das technische Problem zugrunde, ein einfaches Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung bereitzustellen, das die Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimerschen Erkrankung gegen andere Demenzen mit ausreichender Sensitivität und Spezifität erlaubt.

Die Lösung dieses technischen Problems wurde durch die Bereitstellung der in den Patentansprüchen gekennzeichneten Ausführungsformen erreicht.

Es konnte ein Diagnoseverfahren entwickelt werden, das auf der Bestimmung des mitogenen Index (Aktivierungsindex) an peripher zugänglichen Zellen, wie Hautzellen oder Blutlymphozyten, des Patienten mit und ohne mitogener Stimulation beispielsweise nach immuno-magnetischer Zellseparation basiert. Die Aktivierung dieser Zellen geht mit der Oberflächenpräsentation von Aktivierungsmarkern einher, die quantitativ nachgewiesen werden können, vorzugsweise anhand von Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen, wobei vorzugsweise mit Antikörpern beschichtete magnetische Partikeln verwendet werden, was die magnetische Zellseparation und anschließende Quantifizierung der Anzahl der Zellen erlaubt, die diesen Oberflächenmarker vor und nach mitogener Stimulation tragen. Dieses Merkmal zeigt erkrankungsspezifische Abweichungen vom Normalbefund. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt somit die Diagnose der Alzheimer'schen Erkrankung, die Erfassung von präklinischen Erkrankungsphasen sowie die differentialdiagnostische Abgrenzung der Alzheimer'schen Erkrankung gegen andere Demenzen.

Somit betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Diagnose der Alzheimer'schen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung anhand einer Probe von einem Patienten, wobei dieses Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

- (a) mitogene Stimulation der peripher zugänglichen Zellen in der Probe;
- (b) quantitative Bestimmung der mitogen stimulierten Zellen innerhalb der Zellpopulation vor und nach Schritt (a) anhand von einem oder mehreren nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarkern, wobei die Oberflächenmarker tragenden Zellen von den keinen Oberflächenmarker tragenden Zellen unter Verwendung von gegen die Oberflächenmarker gerichteten Antikörpern separiert werden; und

(c) Bestimmung des Stimulationsindex als Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a),

wobei ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist.

Der Fachmann kennt geeignete Maßnahmen, um für das erfindungsgemäße Verfahren geeignete Patientenproben zu erhalten und die mitogen stimulierbare Zellen in ausreichendem Maß enthalten, beispielsweise sind geeignete Proben Hautgewebeproben, Blutproben, vorzugsweise von venösem Blut, Zellen aus dem Liquor cerebrospinalis, sowie Zellen aus Urin.

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens, z.B., bei Verwendung einer Blutprobe, erfolgt zur Stabilisierung vor den weiteren Verfahrensschritten die Zugabe einer koagulationshemmenden Verbindung, z.B., Natriumcitrat oder Heparin.

Der hier verwendete Begriff „Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung“ umfasst auch die Verlaufskontrolle und somit Prognostik, die Kontrolle der Effizienz therapeutischer Maßnahmen und die differentialdiagnostische Abgrenzung der Erkrankung von anderen Demenzen.

Der hier verwendete Begriff „peripher zugängliche Zellen“ bezieht sich auf Zellen, die ohne operative Eingriffe, oder aber (minimal)invasiv dem menschlichen Organismus entnommen werden können und dazu zählen beispielsweise Hautzellen und Lymphozyten der peripheren Bluts, wobei letztere für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt sind.

Die mitogene Stimulation zur Erzielung der Expression der Expression von Oberflächenmarkern kann durch bekannte Stimulatoren erfolgen, wie z.B. Phytohämagglutinin (PHA), Protein A, PWM oder andere trophisch oder mitogen wirkende Verbindungen. Die Stimulation kann durch Zugabe der Einzelverbindungen oder durch kombinierte Zugabe erfolgen.

Der Fachmann kennt geeignete experimentelle Bedingungen für eine solche Stimulation, z.B. hinsichtlich der Konzentration der verwendeten Mitogene, Dauer der Stimulation und sonstigen Inkubationsbedingungen. Dabei sollte die Stimulation in geeigneten Gefäßen erfolgen, die einen ausreichenden Gasaustausch zulassen. Die Konzentrationen der jeweiligen Stimulationsagentien sollten sich im physiologischen Bereich befinden, der z.B. für PHA  $1\mu\text{g/ml}$  bis  $20\mu\text{g/ml}$ , für PWM  $1\mu\text{g/ml}$  bis  $50\mu\text{g/ml}$  und für Protein A  $10\mu\text{g/ml}$  bis  $200\mu\text{g/ml}$  beträgt. Die Dauer der Stimulation richtet sich nach der Geschwindigkeit der Expression des zu untersuchenden Moleküls. Für bestimmte Untersuchungen können aber auch Stimulationszeiten von 2 bis 24 Stunden erforderlich sein; im Falle von CD69 ist eine Stimulationsdauer von 4 Stunden optimal. Die Stimulation sollte unter physiologischen Bedingungen erfolgen und kann z.B. in einem Begasungsbrutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und  $5\%\text{CO}_2$  durchgeführt werden.

Der Fachmann kennt auch geeignete Oberflächenmarker, anhand derer sich eine mitogene Stimulation manifestiert, z.B. CD69, CD25, CD45RO, CD63 oder HLA-DR, wobei der Oberflächenmarker CD69 bevorzugt ist. Es kann für die erfindungsgemäßen Zwecke auch die Bestimmung einer Kombination von Oberflächenmarkern erfolgen oder die weitere Spezifizierung der anhand eines bestimmten Oberflächenmarkers, z.B. CD69, separierten Zellen hinsichtlich weiterer Subpopulationen, z.B. anhand von (z.B.  $\text{CD4}^+$  und/oder  $\text{CD8}^+$  -und/oder  $\text{CD19}^+$  und /oder  $\text{CD56}^+$ ) Subpopulationen.

Der Stimulationsindex (Aktivierungsindex) ergibt sich aus dem Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Stimulation. Ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, stellt ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder eines Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung dar. Ein Stimulationsindex, der weniger als das 10-fache der unstimulierten Kontrollprobe beträgt deutet nicht auf Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung hin. Die Bestimmung der Oberflächenmarker tragenden Zellen kann nach üblichen Verfahren erfolgen, z.B., Western-Blot, ELISA, RIA, FACS, LSC etc.

Vorzugsweise erfolgt zur Bestimmung der Oberflächenmarker tragenden Zelle deren Abtrennung von den keinen Oberflächenmarker oder andere Oberflächenmarker tragenden Zellen anhand charakteristischer Zellmerkmale.

In dem Diagnoseverfahren der vorliegenden Erfindung erfolgt die Separierung der Oberflächenmarker tragenden Zellen von den nicht Oberflächenmarker tragenden Zellen durch gegen (den) die gewünschten Oberflächenmarker gerichtete Antikörper. Dabei kann es sich bei den dafür geeigneten Antikörpern um monoklonale, polyklonale oder synthetische Antikörper oder Fragmente davon handeln. In diesem Zusammenhang bedeutet der Begriff „Fragment“ alle Teile des monoklonalen Antikörpers (z.B. Fab-, Fv- oder „single chain Fv“-Fragmente), welche die gleiche Epitopspezifität wie der vollständige Antikörper aufweisen. Die Herstellung solcher Fragmente ist dem Fachmann bekannt, viele gegen Oberflächenmarker gerichtete Antikörper sind auch im Handel erhältlich.

In der am meisten bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens ist der (sind die) Oberflächenmar-

ker-spezifischen Antikörper an magnetische Partikel, beispielsweise paramagnetische Perlen (z. B. erhältlich von DYNAL A.S, P.O.Box 158 Skøyen, N-0212 Oslo, Norway) gebunden, was die Separation der Zellen mit den entsprechenden Oberflächenmarkern über immuno-magnetische Separation gemäß gängiger Verfahren erlaubt.

Der Stimulationsindex kann dann dadurch bestimmt werden, dass die Menge der mittels des gewünschten Oberflächenmarkers separierten Zellen anhand ihres Nukleinsäuregehalts und/oder Proteingehalts mittels gängiger Verfahren bestimmt wird, z.B. nach Lyse der Zellen durch spektrophotometrische Bestimmung des Nukleinsäure- bzw. Proteingehalts oder nach Anfärbung der Nukleinsäure mittels spezifischer Farbstoffe, z.B. Ethidiumbromid, Propidiumjodid, Acridinorange, DAPI etc über photometrische Quantifizierung. Unter Verwendung von Eichkurven kann aus dem Protein- und/oder Nukleinsäuregehalt der Probe die Zellzahl rechnerisch ermittelt werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen Kit, der zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens geeignet ist und wenigstens folgende Bestandteile enthält:

- (a) Eine Verbindung zur mitogenen Stimulation;
- (b) mindestens einen gegen einen nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarker gerichteten Antikörper, vorzugsweise einen an ein magnetisches Partikel gebundenen Antikörper.

Vorzugsweise enthält der erfindungsgemäße Kit außerdem

- (a) mindestens ein Reaktionsgefäß;
- (b) eine koagulationshemmende Verbindung und/oder einen Puffer zur Zell-Lyse;
- (c) einen Puffer zur Fixierung der Zellen;



- (d) Substanzen die für die quantitative Ermittlung der DNA- bzw. Proteinkonzentration erforderlich sind, sowie vorgefertigte Lösungen zur Herstellung einer Eichkurve;
- (e) einen Magneten zum Separieren der an die Magnetpartikel gebundenen Zellen (enthalten sofern ein an ein magnetisches Partikel gebundener Antikörper eingesetzt wird);  
und
- (f) ein Reagenz zum Ablösen gebundener magnetischer Partikel (enthalten sofern ein an ein magnetisches Partikel gebundener Antikörper eingesetzt wird)

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Kits ist der Antikörper ein anti-CD69-Antikörper. Der Kit kann außerdem noch zusätzlich oder anstelle des anti-CD-69-Antikörpers einen anti-CD4- und/oder anti-CD8-Antikörper enthalten.

Schließlich kann der erfindungsgemäße Kit gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mehreren geeigneten weiteren Nachweismitteln ,z.B., fluoreszenzgekoppelten Primärantikörpern, sekundären Antikörpern, Nachweismitteln für Proteine und/oder Nukleinsäuren, z.B. einem interkalierenden Farbstoff etc., vorliegen.

### **Beispiel**

#### **Bestimmung des mitogenen Stimulationsindex anhand CD69 bei Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung**

Bestimmungen bisher bekannter Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung, die sich am lebenden Patienten durchführen lassen (Biomarker), zeigen nur eine ungenügende Sensitivität und Spezifität oder sind aus Kostengründen oder Gründen des hohen Aufwandes der Testanordnung nicht für Untersuchungen mit hohen Fallzahlen geeignet. Mit klinischen Mitteln beträgt die dia-

gnostische Sicherheit nur 80% bis 90% und bereitet insbesondere in Erkrankungsfrühphasen differential-diagnostische Schwierigkeiten. Die Erkennung von präklinischen Erkrankungsphasen ist aufgrund des Fehlens eines geeigneten Biomarkers derzeit nicht möglich.

Den neurodegenerativen Veränderungen liegen bei der Alzheimer-schen Erkrankung gestörte Prozesse der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale zugrunde. Diese Störungen der intrazellulären Signaltransduktion sind nicht auf das Nervensystem beschränkt. Sie lassen sich in ähnlicher Weise auch an Hautzellen sowie an Lymphozyten des peripheren Blutes dieser Patienten finden. Aufgrund ihrer Erkrankungsspezifität besitzt diese Veränderung diagnostischen Wert und eignet sich als Biomarker.

Im nachfolgenden Beispiel erfolgte die Ermittlung, ob die für die Alzheimersche Erkrankung typische Störung der intrazellulären Vermittlung trophischer und mitogener Signale vorliegt, durch immuno-magnetische Zellseparation CD69 präsentierender Lymphozyten vor und nach mitogener Stimulation.

Die Gewinnung des Blutes erfolgte durch Venenpunktion unter Verwendung eines Blutentnahmesystems der Firma SARSTEDT. Das Blut wird dabei während der Entnahme durch im Blutentnahmesystem integrierte Antikoagulantien, wie z.B. Natriumzitrat oder Natrium-Heparin stabilisiert. In dieser Form kann es 24 bis 48 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt werden. Die Stimulationsexperimente wurden in gut zu belüftenden Reaktionsgefäßen, wie z.B. einer 24 well Suspension-culture-plate der Firma Greiner bio-one durchgeführt. Dafür wurden zu je 400µl stabilisiertem Vollblut die Mitogene Phytohaemagglutinin (PHA), Protein A und Pokeweed-Mitogen (PWM) jeweils einzeln oder in unterschiedlichen Kombinationen eingesetzt. Die Endkonzentrationen der jeweiligen Mitogene lag im physiologischen Bereich

und betrug in diesem Beispiel für PHA 12µg/ml, für Protein A 50µg/ml und für PWM 4µg/ml. Die Stimulation erfolgte unter physiologischen Bedingungen bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% in einem Begasungsbrutschrank für eine Dauer von 4 Stunden. Jeweils 100µl des stimulierten Vollblutes wurden mit verschiedenen Antikörper-beschichteten Magnetpartikeln inkubiert. In diesem Beispiel wurden anti-CD4 sowie anti-CD8 beschichtete Magnetpartikel der Firma DYNAL verwendet. Die entsprechenden Magnetpartikel wurden der jeweiligen Probe im Überschuß (10µl Magnetpartikel-Suspension) zugesetzt, um eine vollständige Isolation der entsprechenden Lymphozyten-Subpopulation zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die entsprechende Lymphozyten-Subpopulation magnetisch separiert und nach darauffolgenden Waschschritten in 100µl definiertes Medium, in diesem Beispiel RPMI1640, versetzt mit 1% fötalem Kälberserum (FKS), überführt. Das Ablösen der gebundenen Magnetpartikel erfolgte in diesem Beispiel unter Verwendung von jeweils 10µl DETACHaBEAD der Firma DYNAL. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten bei Raumtemperatur wurden die abgelösten Magnetpartikel separiert und die Zellsuspension nach mehrmaligem Waschen in ein definiertes Medium, in diesem Beispiel RPMI1640 aufgenommen. Durch Zugabe eines spezifischen Lysepuffers wurden die Zellen aufgeschlossen, die DNA mit spezifischen DNA Farbstoffen, wie z.B. Ethidiumbromid, Propidiumiodid, Acridinorange oder DAPI markiert und diese im Anschluß photometrisch quantifiziert. Unter Verwendung der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford wurde der Proteingehalt der Proben verglichen. Unter Verwendung von Eichkurven wurde aus dem DNA- und/oder Proteingehalt der Probe die Zellzahl rechnerisch ermittelt. Diese Vorgehensweise erlaubte einen direkten Rückschluß auf die Zellzahl. Die Berechnung des Quotienten aus der Zahl CD69 präsentierender Zellen vor und nach mitogener Stimulation (Stimulationsindex) gab Aufschluss über Veränderungen mitogener Stimulierbarkeit dieser Zellen.

Ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ist ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung. Ein Stimulationsindex, der weniger als das 10-fache der unstimulierten Kontrollprobe beträgt, deutet nicht auf Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung hin.

In einem weiteren Experiment erfolgte die Bestimmung des Proteingehaltes der Probe, sowie die Bestimmung des DNA-Gehaltes ohne Zugabe von DNA-färbenden Substanzen zur quantitativen Ermittlung der CD69-präsentierenden Zellen. In diesem Fall wurde die Absorption von DNA bzw. Protein von Licht einer bestimmten Wellenlänge (z.B. 260 nm bzw. 280 nm) gemessen.

## Patentansprüche

1. Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung anhand einer Probe von einem Patienten, wobei das Verfahren die folgenden Schritte umfasst:

(a) mitogene Stimulation der peripher zugänglichen Zellen in der Probe;

(b) quantitative Bestimmung der mitogen stimulierten Zellen innerhalb der Zellpopulation vor und nach Schritt (a) anhand von einem oder mehreren nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarkern, wobei die Oberflächenmarker tragenden Zellen von den keinen Oberflächenmarker tragenden Zellen unter Verwendung von gegen die Oberflächenmarker gerichteten Antikörpern separiert werden;

(c) Bestimmung des Stimulationsindex als Verhältnis der Anzahl der den oder die Oberflächenflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a),

wobei ein Stimulationsindex, der mindestens das 10-fache, maximal das 100-fache der unstimulierten Kontrollprobe erreicht, ein Anzeichen für eine Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadiums oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Probe eine Blutprobe ist und die Zellen Lymphozyten sind.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Oberflächenmarker CD69 ist.

4. Verfahren nach Anspruch 3, wobei die CD69<sup>+</sup>-Zellen hinsichtlich CD4<sup>+</sup>- und/oder CD8<sup>+</sup>-Subpopulationen weiter spezifiziert werden.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei vor Schritt (a) die Stabilisierung des Bluts durch eine oder mehrere koagulationshemmende Verbindungen erfolgt.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Stimulation der Zellen durch PHA, Protein A oder PWM erfolgt.

7. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die Antikörper in Schritt (b) an magnetische Partikel gebunden sind und die Separation über immuno-magnetische Separation erfolgt.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei der Stimulationsindex über die Bestimmung des Proteingehalts und/oder Nukleinsäuregehalts der Oberflächenmarker tragenden Zellen vor und nach Schritt (a) bestimmt wird.

9. Kit zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung, wobei der Kit folgende Bestandteile enthält:

- (a) Eine Verbindung zur mitogenen Stimulation; und
- (b) mindestens einen gegen einen nach mitogener Stimulation exprimierten Oberflächenmarker gerichteten Antikörper.

10. Kit nach Anspruch 9, der außerdem enthält:

- (c) eine koagulationshemmende Verbindung; und/oder
- (d) einen Puffer zur Zell-Lyse.

11. Kit nach Anspruch 9 oder 10, wobei der Antikörper ein an ein magnetische Partikel gebundener Antikörper ist.

12. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, wobei der Antikörper ein anti-CD69-Antikörper ist.

13. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 12, der außerdem einen anti-CD4- und/oder anti-CD8-Antikörper enthält.

## **Zusammenfassung**

### **Schnelltest zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung**

Beschrieben wird ein Verfahren zur Diagnose der Alzheimerschen Erkrankung oder eines Frühstadiums oder einer Prädisposition für diese Erkrankung, das auf der quantitativen Bestimmung mitogen exprimierbarer Oberflächenmarker, vorzugsweise CD69, peripher zugänglicher Zellen, z.B. Hautzellen oder Lymphozyten, (a) vor und (b) nach mitogener Stimulation erfolgt, wobei ein bestimmter Stimulationsindex a:b ein Anzeichen für Alzheimersche Erkrankung oder ein Frühstadium oder eine Prädisposition für diese Erkrankung ist. Schließlich werden auch Kits beschrieben, die zur Durchführung des erfindungsgemäßen Diagnoseverfahrens geeignet sind.